

AU QUICKEL K E JR; SELDEN R; CALDWELL J R; NORA N F; SCHAFFNER W
SO APPL MICROBIOL, (1971) 22 (3), 446-450.
CODEN: APMBAY. ISSN: 0003-6919.

Book 1634
120030

L22 ANSWER 239 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS
AU Watanakunakom, Chatchai; Browder, Henry P.
SO J. Infec. Dis. (1970), 121(2), 124-8
CODEN: JIDIAQ

241336

L22 ANSWER 246 OF 280 BIOSIS COPYRIGHT 1999 BIOSIS DUPLICATE 111
AU GUNN L C; HENGESH J
SO Rev. Surg., (1969) 26 (3), 214.
CODEN: RESUAR. ISSN: 0034-6780.

L22 ANSWER 252 OF 280 MEDLINE DUPLICATE 115
AU Zygmunt W A; Harrison E F; Browder H P; Tavormina P A
SO APPLIED MICROBIOLOGY, (1968 Aug) 16 (8) 1174-8.
Journal code: 6K0. ISSN: 0003-6919.

L22 ANSWER 259 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS
AU Pulverer, G.
SO Z. Med. Mikrobiol. Immunol. (1968), 154(1), 49-53
CODEN: ZMMIA3

L22 ANSWER 260 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS
AU Pulverer, G.
SO Z. Med. Mikrobiol. Immunol. (1968), 154(1), 40-8
CODEN: ZMMIA3

Thank you

990217D957

liegen,
zuerst
folgen-
, zwei-
; MIC-
einmal
waren
i sehen
uf den

eits bei
chiede-
Staph.
nschen
J offen-
te des
te Wir-
Ergeb-
utigen,
sistente
schaften
ndlagen-
jekt zu
isierung
rwendet

Untersuchungen mit Lysostaphin.

II. Lysostaphin-Empfindlichkeit von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft

G. PULVERER

Hygiene-Institut der Universität zu Köln

Eingegangen am 27. Juli 1967

Studies on Lysostaphin

II. Sensitivity of 230 Staph. aureus-strains of Animal Origin to Lysostaphin

Summary. The activity of Lysostaphin on 228 of 230 Staph. aureus-strains of animal origin was the same as seen on staphylococci of human origin. No relations could be found to the origin of the strains and to their resistance against other antibiotics. Two strains, however, were resistant to 100,0 µg/ml of Lysostaphin. These two strains themselves were seen to have lytic effects against many other staphylococci.

Zusammenfassung. In der vorliegenden Arbeit wird die Lysostaphin-Empfindlichkeit von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft (in 14 Instituten aus 22 verschiedenen Tierarten angezüchtet) geprüft. Übereinstimmend mit den Testergebnissen bei Staphylokokken menschlicher Herkunft können 228 der 230 Tierstaphylokokken als gut Lysostaphin-empfindlich bezeichnet werden. Zwei weitere Stämme sind allerdings Lysostaphin-resistent, womit das Vorkommen von Staph. aureus-Stämmen mit einer Lysostaphin-Resistenz nachgewiesen erscheint. Entsprechende Schlußfolgerungen werden diskutiert.

Die Wirksamkeit von Lysostaphin ist unseres Wissens bei Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft noch nicht überprüft worden. In unserer zweiten Mitteilung soll daher über die Ergebnisse einer Lysostaphin-Testung bei 230 koagulasepositiven Staphylokokken aus dem Tierreich berichtet werden.

Material und Methodik

Die 230 koagulasepositiven Staphylokokkenstämme wurden in 14 Instituten Deutschlands und Frankreichs aus 22 verschiedenen Tierarten angezüchtet [siehe 11, 13, 14, 16]. Die Stämme einer Tierart stammen stets aus verschiedenen Instituten, z. B. wurde die 102 Rinder-Staphylokokken in 10 Instituten isoliert. Damit glauben wir auch hier ein repräsentatives Material vorlegen zu können.

Die Methodik blieb unverändert und ist bereits in der ersten Mitteilung ausführlich besprochen worden. Gewertet wurden auch hier nur die 48 Std-Ergebnisse, da sie zum Teil schlechter waren als die 24 Std-Resultate (190mal gleich, 35mal eine Stufe, viermal zwei Stufen und einmal drei Stufen schlechter). Als Inoculum verwendeten wir eine mittlere Staphylokokken-Einsaat (durchschnittlich $7,7 \cdot 10^6$ Staphylokokken/ml).

Ergebnisse

In der Tab. 1 haben wir die Lysostaphin-Empfindlichkeit der 230 Tier-Staphylokokken ihrer Herkunft gegenübergestellt. 102 Stämme wurden von Rindern angezüchtet, 44 Stämme aus Hasen, 25 aus Hühnern, 8 aus Hunden, je 7 aus Schweinen und Rebhühnern und 6 Staphylokokken aus Pferden. Die restlichen 31 Stämme wurden aus weiteren 15 Tierarten isoliert. Auffällige Besonderheiten in der Lysostaphin-Empfindlichkeit

Tabelle 1. *Lysostaphin-Empfindlichkeit und Herkunft von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft (isoliert aus 22 Tierarten)*

Herkunft	Zahl	Minimale Hemmkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$							
		>10,0	5,0	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075
Rinder	102	—	—	2	7	21	29	31	12
Hasen	44	—	—	—	4	11	12	13	4
Hühner	25	—	—	—	3	6	5	8	3
Hunde	8	—	—	1	1	—	3	3	—
Schweine	7	—	—	1	1	2	—	2	1
Rebhühner	7	1	—	—	—	—	4	1	—
Pferde	6	—	—	—	1	2	1	2	—
übrige Tierarten	31	1	1	1	1	6	9	9	3
zusammen	230	2	1	5	18	48	63	69	23
									1

bei Staphylokokken bestimmter Tierarten sind nicht nachzuweisen. Die minimalen Hemmwerte (MIC) liegen bei den meisten Stämmen (180 der 230 Stämme) bei Lysostaphin-Konzentration zwischen 0,15 und 0,62 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 23 Staphylokokken werden bei 0,075 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gehemmt, ein Stamm sogar bei 0,037 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 18 Stämme haben einen MIC-Wert von 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 weitere Stämme von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und ein Stamm sogar von 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Aus dem Rahmen fallen lediglich die beiden Tier-Staphylokokkenstämme Al 102 und Al 156 mit einer Lysostaphin-Resistenz von über 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der Stamm Al 102 wurde aus einem Rebhuhn angezüchtet und hat die folgenden Merkmale: Eigelb-positiv, Fibrinolysin-negativ, Hyaluronidase-positiv, Pigmentbildner, Hämolysebildner, fermentiert Mannit aerob und anaerob, resistent gegen Penicillin G, schwache Lysisreaktion gegen die gebräuchlichen Antibiotika, mit den Phagen des Internationalen Basissatzes keine Lysisreaktionen. Von beiden Stämmen haben wir je fünf Einzelkolonien geprüft, wobei in allen Fällen sogar bei Lysostaphin-Konzentrationen von 100,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ noch Wachstum vorlag. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse von anderer Seite ist eingeleitet.

Tabelle 2. *Lysostaphin-Empfindlichkeit von Staph. aureus-Stämmen*

P	S	C	T	E	Zahl	Minimale Hemmkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$		
						>10,0	5,0	2,5
+	+	+	+	+	156	1	1	3
R	+	+	+	+	40	1	—	1
R	R	+	R	+	9	—	—	—
R	+	+	R	+	8	—	—	—
übrige					17	—	—	1
						zusammen	230	2
							1	5

+ empfindlich; R resistent; P Penicillicol; T = Tetracyclin; E = Erythromycin

Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der Resistenz sind in der Tab. 2 ist das Gros der Tier-Staphylokokken (230 Stämme), 40 Stämme sind Penicillicol, 180 Stämme sind Penicillin G und Erythromycin-fachresistent. Die restlichen 17 Stämme zeigen weitere Antibiogramme. Auch hier ist die Verteilung der MIC-Werte auf die 230 Stämme gleichmäßig.

Diskussion

Übereinstimmend mit den in Testergebnissen bei Staph. aureus-Stämmen erweisen sich auch die Tier-Staphylokokken. 180 der 230 geprüften Stämme haben Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,62 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 24 Stämme lagen die MIC-Werte bis zu drei Verdünnungsstufen höher. Bactericidie-Konzentrationen ideal lagen sie eine Stufe höher, viermal höher als die Verdünnungsstufen. Auch hier waren die Stämme zu sehen, die wir ebenfalls denken. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der Herkunft der Staphylokokken ist unterschiedlich.

Zwei der 230 Staph. aureus-Stämme zeigen eine Lysostaphin-Resistenz. Der eine Stamm ist resistent, der andere Stamm ist resistent. Der eine Stamm wurde aus einer Taube, der andere Stamm aus einer Taube.

Tabelle 2. *Lysostaphin-Empfindlichkeit und Antibiotica-Resistenz von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft*

P	S	C	T	E	Zahl	Minimale Hemmkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$									
						>10,0	5,0	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075	0,037	
+	+	+	+	+	156	1	1	3	12	37	38	47	17	—	
R	+	+	+	+	40	1	—	1	4	5	17	11	—	1	
R	R	+	R	+	9	—	—	—	—	4	4	4	1	—	
R	+	+	R	+	8	—	—	—	2	3	1	1	1	—	
übrige						17	—	—	1	—	3	6	4	—	
zusammen						230	2	1	5	18	48	63	69	23	1

+ empfindlich; R resistant; P Penicillin G; S Streptomycin; C Chloramphenicol; T = Tetracyclin; E = Erythromycin.

Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der 230 Stämme und ihre Antibiotica-Resistenz sind in der Tab. 2 gegenübergestellt. Wie zu erwarten, ist das Gros der Tier-Staphylokokken empfindlich gegen Penicillin G, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Erythromycin (156 der 230 Stämme), 40 Stämme sind Penicillin G-resistant, 8 weitere Stämme unempfindlich für Penicillin G und die Tetracycline sowie 9 Stämme dreifachresistant. Die restlichen 17 Staphylokokken verteilen sich auf neun weitere Antibiogramme. Auch hier lassen sich keine Parallelen feststellen, die Verteilung der MIC-Werte auf die verschiedenen Antibiogramme erscheint gleichmäßig.

Diskussion

Übereinstimmend mit den in der ersten Mitteilung diskutierten Testergebnissen bei Staph. aureus-Stämmen menschlicher Herkunft erwiesen sich auch die Tier-Staphylokokken als gut sensibel für Lysostaphin. 180 der 230 geprüften Stämme wurden durch Lysostaphin-Konzentrationen zwischen 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0,62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gehemmt, bei 24 Stämmen lagen die MIC-Werte niedriger, bei weiteren 24 Stämmen bis zu drei Verdünnungsstufen höher. Bei 210 der Stämme waren die Bactericidie-Konzentrationen identisch mit den MIC-Werten, 14mal lagen sie eine Stufe höher, viermal zwei Stufen und zweimal drei Verdünnungsstufen. Auch hier waren nicht selten „Springer“ im Röhrchen-Test zu sehen, die wir ebenfalls dem Inoculum-Effekt zuschreiben möchten. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der Stämme war unabhängig von der Herkunft der Staphylokokken und ihrer Antibiotica-Resistenz.

Zwei der 230 Staph. aureus-Stämme tierischer Herkunft erwiesen sich als Lysostaphin-resistant. Ihre Lysostaphin-Hemmwerthe lagen über 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bei Prüfung von Einzelkolonien sogar über 100,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der eine resistente Stamm wurde aus einem Rebhuhn angezüchtet, der zweite aus einer Taube. Beide Stämme werden von uns als Staph. aureus

angesprochen, da sie die vom Staphylokokken-Subkomitee für Taxonomie [22] festgelegten Merkmale erfüllen: grampositive Haufenkokken, Catalase-positiv, aerobe und anaerobe Fermentierung von Glucose in dem vom Subkomitee angegebenen Medium [siehe 22], völlige Koagulation von Kaninchenplasma im Röhrchentest innerhalb von 24 Std.

Mit der Auffindung dieser beiden Lysostaphin-resistenten Stämme ist uns anscheinend das erste Mal der Nachweis gelungen, daß zumindest bei einigen wenigen *Staph. aureus*-Stämmen mit einer Lysostaphin-Unempfindlichkeit auch *in vivo* zu rechnen ist. BROWDER u. Mitarb. [2] gelang dagegen nur die Isolierung einer Lysostaphin-unempfindlichen Mutante des *Staph. aureus*-Stammes „Copenhagen“ im Labor. Zu bemerken ist, daß eine Lysostaphin-Unempfindlichkeit offenbar bei *Staph. epidermidis*-Stämmen ebenfalls vorkommt [20]. Worauf diese Lysostaphin-Resistenz bei *Staph. aureus*-Stämmen beruht und ob sie eventuell nur bei Stämmen tierischer Herkunft zu finden ist, muß heute noch offen bleiben. In diesem Zusammenhang erscheinen jedenfalls unsere Beobachtungen interessant, daß bei beiden Lysostaphin-resistenten Stämmen ein wachstumshemmender Effekt gegen andere *Staph. aureus*-Stämme besteht. Untersuchungen in dieser Richtung wurden eingeleitet.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau B. AXER u. Fr. I. ZUR MÜHLEN sei an dieser Stelle für ihre unermüdliche Mitarbeit herzlich gedankt.

Literatur

1. BROWDER, H. P., W. A. ZYGMUNT, J. R. YOUNG, and P. A. TAVORMINA: Lysostaphin: enzymatic mode of action. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 383–389 (1965).
2. — — and P. A. TAVORMINA: Lysis of micrococcaceae by lysostaphin. *Bact. Proc.* **1966**, A 82.
3. CROPP, C. B., and E. F. HARRISON: The in vitro effect of lysostaphin on clinical isolates of *staphylococcus aureus*. *Canad. J. Microbiol.* **10**, 823–828 (1964).
4. FRITSCHE, D., u. G. PULVERER: Methicillinresistente Staphylokokken. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **199**, 170–180 (1966).
5. GROVE, D. C., and W. A. RANDALL: Assay methods of antibiotics. A laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia, Inc. 1955.
6. GRÜN, L., u. G. PULVERER: Ergebnisse einer Differenzierung von Staphylokokken des Phagtyps „80“. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **146**, 385–396 (1960).
7. — — Vergleichende Untersuchungen an pathogenen Staphylokokken aus Eiterungsprozessen und aus Sektionsmaterial. *Z. med. Mikrobiol. u. Immunol.* **153**, 1–12 (1966).
8. HARRISON, E. F., and C. B. CROPP: Comparative in vitro activities of Lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **13**, 212–215 (1965).
9. — — Therapeutic activity of Lysostaphin in experimental staphylococcal infections. *Canad. J. Microbiol.* **13**, 93–97 (1967).
10. HAWIGER, J., and J. JELJASZEWICZ: Sensitivity of *Staphylococcus aureus* to Lysostaphin, Cephalotin, Benzyl Penicillin and semi-synthetic Penicillins. Proceedings Vth International Congress of Chemotherapy, Vienna (Austria), Vol. III, pp. 35–37 (1967).
11. PULVERER, G.: Pathogene Staphylokokken. Bedeutung biologischer Reaktionen und der Virulenz. Habilitationsschrift. — — Lysotypie der Staphylokokken. In G. PULVERER: *Praxis*. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. 1966.
13. — — Vergleich pathogener Staphylokokken. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **201**, 27–41 (1966).
14. — — Studies on classification of animal coagulase-positive Staphylokokken. *Mikrobiol. t. V*, z. 2, 429–433 (1966).
15. — — D. FRITSCHE: Bestehen Zusammenhang zwischen Resistenz, der Phaggruppenzugehörigkeit und Fermentspektrum pathogener Staphylokokken. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **64**, 76 (1965).
16. — — A. LUCAS: Versuche zur Differenzierung tierischer Herkunft. *Z. med. Mikrobiol.* **1966**, A 82.
17. SCHINDLER, CH. A.: Staphylococcal sensitivity. *Nature (Lond.)* **209**, 1368 (1966).
18. — — and V. T. SCHUHARDT: Lysostaphin: Lysis of *Staphylococcus aureus*. *Proc. nat. Acad. Sci.* **62**, 1065–1069 (1965).
19. — — Purification and properties of Lysostaphin. *Biochem. biophys. Acta* **1966**, A 82.
20. SCHUHARDT, V. T.: Diskussionsbemerkungen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **1965**, 1065–1069.
21. — — and CH. A. SCHINDLER: Lysostaphin-tolerant *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* **88**, 815–816 (1965).
22. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci. *Int. Bull. bact. Nomencl.* **15**, 1–10 (1965).
23. TIPPER, D. J., and J. L. STROMINGER: Is Acetylglucosamine and 4-O- β -N,6-O-D-glucosamine a component of the cell wall of *Staphylococcus aureus*? *Biochem. biophys. Res. Commun.* **22**, 10–14 (1965).
24. ZYGMUNT, W. A., H. P. BROWDER, and G. PULVERER: Lysostaphin, Neomycin, and Bacitracin. *J. Microbiol.* **12**, 204–206 (1966).
25. — — — Growth inhibition of unusual *Staphylococcus aureus* by Lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **12**, 341–345 (1966).
26. — — — Influence of blood and serum on the activity of Lysostaphin. *J. Bact.* **91**, 725–728 (1966).
27. — — — E. F. HARRISON, and H. P. BROWDER: Lysostaphin and Penicillins against *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **13**, 491–492 (1967).

Pr
Ob
der
500
Für

11. PULVERER, G.: Pathogene Staphylokokken bei Mensch und Tier sowie im Freiland. Bedeutung biologischer Reaktionen für die Aufklärung der Epidemiologie und der Virulenz. Habilitationsschrift, Köln 1963.
12. — Lysotypie der Staphylokokken. In GRÜN: Staphylokokken in Klinik und Praxis. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. m. b. H. 1964.
13. — Vergleich pathogener Staphylokokken von Mensch und Tier. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 201, 27—41 (1966).
14. — Studies on classification of animal coagulase-positive staphylococci. Postepy Mikrobiol. t. V, z. 2, 429—433 (1966).
15. —, u. D. FRITSCHE: Bestehen Zusammenhänge zwischen der Penicillin G-Resistenz, der Phaggruppenzugehörigkeit, der Antigenstruktur und dem Fermentspektrum pathogener Staphylokokken? Z. Hyg. Infekt.-Kr. 151, 64—76 (1965).
16. —, u. A. LUCAS: Versuche zur Differenzierung pathogener Staphylokokken tierischer Herkunft. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 353—361 (1966).
17. SCHINDLER, CH. A.: Staphylococcal strains with relation to Lysostaphin sensitivity. Nature (Lond.) 209, 1368—1369 (1966).
18. —, and V. T. SCHUHARDT: Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 414—421 (1964).
19. — — Purification and properties of Lysostaphin — a lytic agent for Staphylococcus aureus. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 97, 242—250 (1965).
20. SCHUHARDT, V. T.: Diskussionsbemerkung. Ann. N. Y. Acad. Sci. 128, 19—24 (1965).
21. —, and CH. A. SCHINDLER: Lysostaphin-therapy in mice infected with Staphylococcus aureus. J. Bact. 88, 815—816 (1964).
22. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci: Recommendations. Int. Bull. bact. Nomencl. 15, 109—110 (1965).
23. TRIPPER, D. J., and J. L. STROMINGER: Isolation of 4-o- β -N-Acetylmuramyl-N-Acetylglucosamine and 4-o- β -N,6-o-Diacetylmuramyl-N-Acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of Staphylococcus aureus. Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 48—56 (1966).
24. ZYGMUNT, W. A., H. P. BROWDER, and P. A. TAVORMINA: In vitro effect of Lysostaphin, Neomycin, and Bacitracin on Staphylococcus aureus. Canad. J. Microbiol. 12, 204—206 (1966).
25. — — Growth inhibition of unusual strains of Staphylococcus aureus by Lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics. Canad. J. Microbiol. 12, 341—345 (1966).
26. — — Influence of blood and serum on the antistaphylococcal activity of Lysostaphin. J. Bact. 91, 725—728 (1966).
27. — E. F. HARRISON, and H. P. BROWDER: Microbiological activities of Lysostaphin and Penicillins against Bacteriophage 80/81 strains of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 13, 491—493 (1965).

Priv.-Doz. Dr. med. G. PULVERER
Oberarzt am Hygiene-Institut
der Universität zu Köln
5000 Köln-Lindenthal
Fürst Pückler-Str. 56